

H

Publication No.: Hei.6-30592  
Published on: April 27, 1994  
Application No.: Sho.59-174214  
Filing Date: August 23, 1984  
Priority: August 24, 1983 GB 8322750  
October 11, 1983 GB 8327193  
Applicant: CPC INTERNATIONAL INC.  
Inventors: Jean-Claude de Troostenbergh  
Bernard Léon Henri Marie Avalosse  
Title: Industrial-scale process for the production and  
collection of polyol mixture by fermentation of sugars

Claims:

1. An industrial process for producing and collecting a polyol mixture comprising glycerol and erythritol by the aerobic fermentation of a suitable sugar by Moniliella tomentosa var. pollinis is characterized in that ribitol is also produced and that the proportion of ribitol in the polyol mixture and the total polyol yield are increased by increasing the degree of aeration of the fermentation medium.
2. A process according to Claim 1 characterized in that the air or an oxygen/inert gas composition approximating to that of air is supplied at a rate of 0.1 & to 1.5 litre/litre of fermentation medium/minute.
3. A process according to Claim 1 or Claim 2 characterized in that cells of the Moniliella tomentosa var. pollinis are recycled from a previous fermentation.
4. A process according to Claim 3 characterized in that 5% to 100% of the cells from a previous fermentation are recycled to the process.
5. The process of any one of the claims 1 to 4 characterized in that the sugar is dextrose.

6. The process of any one of the claims 1 to 5 characterized in that the sugar is present in the fermentation broth at the beginning of the fermentation in an amount of between 20% and 45%.

7. The process of any one of the claims 1 to 6 characterized in that the pH at the beginning of the fermentation is adjusted to between 3 and 6, preferably between 4 and 5.

8. The process of any one of the claims 1 to 7 characterized in that Xanthan gum is present in an amount between 100 ppm and 500 ppm of the fermentation medium.

9. The process of any one of the claims 1 to 8 characterized in that a conventional antifoam agent is also added to the fermentation.

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 特 許 公 報 (B 2)

(11) 特許出願公告番号

特公平 6 - 3 0 5 9 2

(24) (44) 公告日 平成 6 年 (1994) 4 月 27 日

(51) Int. Cl. <sup>5</sup>  
C12P 7/18  
// (C12P 7/18  
C12R 1:645 )

識別記号 庁内整理番号 F I  
9282-4B

発明の数 1 (全 4 頁)

(21) 出願番号 特願昭 59 - 1 7 4 2 1 4  
(22) 出願日 昭和 59 年 (1984) 8 月 23 日  
(65) 公開番号 特開昭 60 - 1 1 0 2 9 6  
(43) 公開日 昭和 60 年 (1985) 6 月 15 日  
(31) 優先権主張番号 8 3 2 2 7 5 0  
(32) 優先日 1983 年 8 月 24 日  
(33) 優先権主張国 イギリス (GB)  
(31) 優先権主張番号 8 3 2 7 1 9 3  
(32) 優先日 1983 年 10 月 11 日  
(33) 優先権主張国 イギリス (GB)

(71) 出願人 999999999  
シー・ビー・シー・インターナショナル  
・インコーポレイテッド  
アメリカ合衆国 ニュー・ジャージー州  
、エングルウッド・クリフス、インター  
ナショナル・プラザ (番地無し)  
(72) 発明者 ジャン・クロード、ドウ、トロステンベ  
ルク  
ベルギー国、ウーウアート、クレールベ  
ーク モーレン、305  
(72) 発明者 ベルナル、レオン、アンリー、マリー  
・アヴァロツズ  
ベルギー国、アジモン、リュ、デユ、コ  
ルミー 74  
(74) 代理人 弁理士 江崎 光好 (外 1 名)

審査官 内田 俊生

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 糖類の発酵によりポリオール混合物を工業的規模で製造、採取する方法

1

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 モニリエラ・トメントサ・パール・ポリニス (Moniliella tomentosa var. pollinis) による適当な糖の好気性発酵によりグリセロールおよびエリトリールよりなるポリオール混合物を工業的に製造、採取する方法において、発酵培地中の通気の程度を増加することにより、リビトールがまた生産され、そしてポリオール混合物中のリビトールの割合および全ポリオールの収量が増加されることを特徴とする方法。

【請求項 2】 空気または空気の組成に近い酸素／不活性ガス組成物が 0.1% ないし 1.5% / 発酵培地 % / 分の割合で供給される特許請求の範囲第 1 項記載の方法。

【請求項 3】 モニリエラ・トメントサ・パール・ポリニスの細胞が前の発酵から再循環されることを特徴とする特許請求の範囲第 1 項または第 2 項記載の方法。

2

【請求項 4】 前の発酵からの細胞の 5% ないし 100% が再循環されることを特徴とする特許請求の範囲第 3 項記載の方法。

【請求項 5】 糖がデキストロースであることを特徴とする特許請求の範囲第 1 項～第 4 項のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6】 発酵の初めに糖が 20% と 45% の間の量において発酵プロセス中に存在することを特徴とする特許請求の範囲第 1 項～第 5 項のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7】 発酵の初めに pH が 3 と 6 の間、好適には 4 と 5 の間に調整されることを特徴とする特許請求の範囲第 1 項～第 6 項のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8】 キサンタンガム (Xanthan gum) が発酵培地の 100 ppm と 500 ppm の間の量において存在す

ることを特徴とする特許請求の範囲第1項～第7項のいずれか1項に記載の方法。

【請求項9】通常の消泡剤がまた発酵に対し添加されることを特徴とする特許請求の範囲第1項～第8項のいずれか1項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

本発明はモニリエラ・トメントサ・パール・ポリニス(*Moniliella tomensosa* var. *polli-nis*)のような糖寛容性の菌で糖を好気性発酵させることによりグリセロールおよびエリトリトールよりなるポリオール混合物を工業的規模で製造、採取する方法に関する。

酵母様の菌であるモニリエラ・トメントサ・パール・ポリニスによる適当な糖の好気性発酵はエリトリトールを生産することが知られている。このことは、先ずG. J. Hajny, J. H. SmithおよびJ. C. Garverにより *Appl. Microbiology* 12, p. 240-246 (5月1964) に報告された。そして彼等は微生物をトルラI<sub>2</sub>A (*Torula I<sub>2</sub>A*) と命名した。後に、Auto-nie van Leeuwenhoek 37, p. 107-118 (1971) において、L. Dooms, G. L. HennebertおよびH. Verachtertはこの菌をモニリエラ・トメントサ・パール・ポリニスとして分類し、そのエリトリトールを生産する能力を確認した。この著者等は、またこの微生物の完全な形態学的記述をし、これには参考文献が加えられている。更に、彼等は、モニリエラは殊に適用した培養条件にしたがい2つの形、すなわち酵母様の形と糸状菌様の形のもとに存在することができることを認めている。上記文献のp. 110において、彼等は次のように述べている。

「寒天斜面培地では両方の形がつくられる。静置液体培地では、豊富な菌糸と、分芽胞子より多い分節胞子をもつ糸状菌様の形が発達する。振盪フラスコ培養では、出芽および分裂につくられる円形、卵形、および方形の細胞をもつ酵母様の形が優勢であり、菌糸は形成されない。」

従来の当業界の専門家達は、モニリエラ・トメントサ・パール・ポリニスによる糖の発酵からグリセロール、エリトリトール、およびアラビトールが生産されることを報告しているが、本発明者等はその工業的に発展させた方法では、発酵生産物は種々な量におけるグリセロール、エリトリトール、およびリビトールよりなることを見出した。グリセロールは市販されてよく知られているものであるが、エリトリトールとリビトールは今まで意義のある工業的規模で手に入れることができなかったものである。これらの生成物の両者は化学的中間体として興味ある性質をもち、そのポリヒドロキシル官能性は例えばポリウレタンおよび他のポリマーの製造における原料のような多数の使用を示す。それ故に、グリセロールよりも多くのエリトリトールおよびリビトールを生産するように発酵反応に影響を与えることができることは明らかに価値があることである。なぜならば、グルセロール

は他の資源から容易に手に入れることができるからである。その上、ヘキソースモノホスフェート経路を通しての発酵の論理的コースから、発酵した糖のより多くがグリセロール(50%)よりもリビトール(83%)およびエリトリトール(66%)に変換され得るのである。

さて、本発明者等は、発酵培地の通気の程度を調整することにより、リビトールの生産が増加しそして同時に全ポリオールの収量が増加するように発酵のポリオール成分の分布に影響を与える手段を見出した。さらに、ポリオールの収量における増加は、前の発酵からの細胞を発酵培地に再循環することにより得ることがでる。

低い通気割合では、エタノールと一緒にエリトリトールが優位に生産されることが、すでにHajnyにより報告されている。さて、本発明者等は、より高い通気割合では、エタノールの生産は最小にされるが、さらに生産物中のリビトールの割合が実質的に増加する(2%以下から20%またはそれ以上まで)ことを見出した。

それ故に、より高い酸素の移動割合は、最も経済的に魅力的なポリオールへの糖の変換を最適にする手段を提供する。酸素の移動割合を変えることにより、異なつた応用に対し望ましいような異なつたポリオールの割合をポリオール生産物中に得ることができるのである。

発酵の変換収量を増加する他の手段は、生物量を再循環すること、すなわち1つの発酵から除去された細胞を接種物として次の発酵に用いることである。

それ故に、本発明によるモニリエラ・トメントサ・パール・ポリニスによる適当な糖の好気性発酵によりグリセロールおよびエリトリトールよりなるポリオール混合物を工業的に製造、採取する方法は、発酵培地の通気の程度を増加することにより、リビトールがまた生産され、そしてポリオール混合物中のリビトールの割合および全ポリオールの収量が増加されることにより特徴づけられる。

その上、ポリオールの収量におけるさらに増加は、前の発酵からの細胞の再循環によりなしとげられることができる。

“通気の種類”は、例えば羽根車の速度または攪拌機の回転速度により示されるような培地の攪拌の程度と結びついた反応培地への酸素の供給量で構成された、結合した因子である。一般に、所定の大きさの発酵容器では、供給される酸素の所定の量に対し容器の内容物の攪拌の程度の増加は形成されるリビトールの量を増加する。同様に、一定の攪拌では、供給される酸素の量における増加は同じ効果を生ずる。しかしながら、明らかに発酵容器に供給される酸素の所定の量に対しては攪拌の最適な程度があり、逆もまた同じであり、そして最適な条件は、常に、最適まで供給される酸素を増加することまたは攪拌の程度を増加することがリビトールの所定の生産を与えるということを心にとめて、簡単な実験を行なうことにより決めることができる。本発明者等は、また、

最適条件は発酵容器の大きさに従つて変わることを、そして、一般に、より小さい容量の発酵容器よりもより大きい発酵容器に供給される酸素の所定の割合に対しては攪拌の程度はより小さくてもよいことを見出した。

好適には、酸素は、空気または空気の組成に近い酸素／不活性ガス組成物として、0.1 ℓ ないし 1.5 ℓ / 発酵培地 ℓ / 分、好ましくは 0.5 ℓ ないし 1.5 ℓ / 発酵培地 ℓ / 分の範囲内の割合で供給され、攪拌の程度は発酵容器の所定の大きさに対しこの範囲内の空気の流動

に最適であるように選ばれる。  
“前の発酵からの細胞の再循環”は、発酵を開始させるために用いられる細胞の一部または全部が前の発酵から誘導されることを意味する。再循環される生物量は前の発酵の生物量の 5 % から 100 % まで変えられることができる。後記する窒素源も、また再循環する生物量に応じて種々の量において発酵培地に添加されることができる。100 % の細胞が再循環されるとき、窒素源は省略されることができ、そのため細胞は糖だけを発酵し、それにより発酵培地をつくり上げる費用を非常に減少することができる。いずれの場合においても、再循環される細胞の % および添加される窒素源の量は、1 つの培養から他の培養に効果的な発酵力を確実にするように選択されるべきである。

本発明方法を実施することにより、発酵で生産されるポリオールの混合物、すなわちグリセロール、エリトリールおよびリビトールの混合物は 20 重量 % 以上のリビトールを含有する。

モニリエラ・トメントサ・パール・ポリニスは、オランダ国 Baarn の Centraal Bureau voor Schimmelcultures (CBS) より CBS 461.67 として手に入れることができ、この菌はまた英国 Ferry Lane, Kew, Richmond, Surrey TW9

3 A F の Commonwealth Mycological Institute Culture Collection (CMI CC) に番号 (CMICC) 271648 のもとに寄託されており、ここより一般に手に入れることができる。この微生物の細胞は、麦芽エキス (4 %)、酵母エキス (0.2 %)、および寒天 (2 %) を含有する固体培地で培養される。このようにして形成された培養物は、つぎに糖 (その量は後記する) および窒素源を含有する殺菌した培地に接種される。

発酵は 3 と 6 の間、好適には 4 ないし 5 の出発 pH で、27 °C と 32 °C の間の温度で行なわれる。発酵は糖が消費されたときに停止される。培地に含有される糖の量は 20 % と 45 % の間、好適には 30 % ないし 35 % である。培地および発酵の両方に用いるのに適する糖は、デキストロース (グルコース)、シュクロース、フラクトース、またはマルトースである。(本明細書の発明の詳細な説明および特許請求の範囲において、特に言明しないかぎり、% および部は容量 % および容量部である)。

従来の方法では、Hajny により記載されているように、種々の窒素源、例えば酵母エキス、窒素、コーンステープリカー、麦芽、最終糖蜜、麦芽エキス、およびジステラズ・ドライ・ソルブルが発酵に用いられている。本発明方法では、0.5 % 酵母エキス + 0.1 % 尿素で、あるいは 3 % コーンステープリカー + 0.02 % 尿素で良い結果が得られる。出発 pH は約 3.0 と 6.0 の間にあるべきであり、この pH は発酵中に約 2.0 ないし 3.5 に減少される。L. Hanssens, A. van Regenmortel, および H. Verachtert, *Applied Microbiology*, Vol. 24, No. 5, p. 831-833 (1972) によると、異なる一定 pH で行なわれた実験室での発酵は全ポリオールおよびエリトリールの収量に実質的な差異を生ずるということである。本発明者等は、より大きな規模の発酵 (2 ℓ の発酵槽またはそれ以上の発酵槽) を実施するとき、全ポリオールおよびエリトリールの収量は 4.0 ないし 6.0 の範囲内の出発 pH に対してはさほど敏感でないことを見出した。汚染の問題を避けるため、または最小にするためには、4 ないし 5 の出発 pH が好ましい。発酵は糖がすべて消費されるまで行なわれ (発酵時間は使用する糖の量により通常 4 日と 12 日の間である)、その後、培養は停止され、細胞が例えば遠心分離により培養ブロスより除去される。細胞を含まない培養ブロスは、エリトリール、リビトール、およびグリセロールを含有し、それ自体で、精製し (例えば限外濾過および脱鉱物により)、また精製することなく、若干の用途に、例えばポリマー工業に用いられることができる。精製した培養ブロスは、また 60 % ないし 80 % 溶解した固体まで濃縮されることができ、そしてこれから例えば J. M. Roxburg, J. F. T. Spencer, および H. R. Sallens により *Canadian Journal of Technology*, Vol. 34, p. 248-253 (1956) に記載された技術により、エリトリールが結晶化されることができ。エリトリールの結晶の回収後に残存する液—この液は (結晶化されなかつた) エリトリール、リビトール、およびグリセロールの混合物である—は、また適当な処理後に用いられることができる。

本発明方法は、発酵培地中にモニリエラ・トメントサ・パール・ポリニスの細胞を保持する性質を有する多糖類キサタンガム (Xanthan gum) を存在させ、発酵中に生ずる泡を媒介とする細胞の損失を減少させることにより、有利に実施することができる。好適には 100 ppm ないし 500 ppm のキサタンガムを存在させることができ、約 300 ppm の存在で優れた結果が得られる。発酵培地中に細胞を保持するのに必要であるより多い (すなわち、約 500 ppm より多い) ガムを用いることもできるが、このような過剰量是不経済である。

全面的な方法は、また従来の消泡剤を発酵培地に含有させることにより改良される。合成消泡剤 (例えばシリコンタイプまたは脂肪族アルコール) は天然の生成物 (例えばラード油) よりも好適である。なぜならば、合成消

泡剤はずつと小量で使うことができ、そして最終の発酵ブ罗斯はそれを除去するための広範な精製を必要としないからである。市販の大抵の合成消泡剤は 200 - 300 ppm または 400 ppm を用いれば、最適の泡制御に對し十分である。

次の例は本発明の実施を例示するためのものである。

#### 接種用培養物の調製

2.0 % デキストロース、0.5 % 酵母エキス、0.1 % 尿素、および 300 ppm キサンタンガムよりなる培地 50 ml を入れた 500 ml エrlenmeyer フラスコに固体培地からのコロニーが接種され、出発 pH 5、温度 30 °C で 100 振動/分の往復攪拌のもとに、3 日ないし 4 日間培養が行なわれた。これらの培養物が以下の例に用いられた。

#### 例 1

3.2 % デキストロース、0.5 % 酵母エキス、0.1 % 尿素、300 ppm キサンタンガム、および 300 ppm SAG 471 (ユニオン・カーバイドからのジメチルポリシロキサン消泡剤) からなる培地 1.5 ℓ を入れた 6 つの 2 ℓ 発酵槽に発酵培地の容量の 2 % の量で接種用培養物が接種された。空気の流速は 0.6 ℓ 空気/発酵培地 ℓ /分であつた。異なつた羽根車の速度が、400 rpm から 740 rpm まで変えて、発酵槽にセツトされた。温度は 30 °C で一定に保持され、発酵は 11 日間行なわれた。この期間の最後に、発酵培地の組成が分析され、そしてポリオール収量および組成が計算された。その結果は第 1 表に示すとおりである。

第 1 表

| 羽根車の速度<br>rpm | エリトリトール  |       | グリセロール   |       | リビトール    |       |
|---------------|----------|-------|----------|-------|----------|-------|
|               | 収量 % (1) | % (2) | 収量 % (1) | % (2) | 収量 % (1) | % (2) |
| 400           | 28.5     | 87    | 3.8      | 12    | 0.4      | 1     |
| 485           | 28       | 89    | 3.2      | 10    | 0.3      | 1     |
| 535           | 30.7     | 88    | 3.5      | 10    | 0.5      | 2     |
| 620           | 36.8     | 80    | 6.5      | 14    | 2.4      | 6     |
| 665           | 35.8     | 70    | 10.0     | 20    | 5.2      | 10    |
| 740           | 29.6     | 56    | 13.7     | 26    | 9.1      | 10    |

(註) (1) 消費したデキストロースに基づく。

(2) 全ポリオールに基づく。

#### 例 2

3.2 % デキストロース、300 ppm キサンタンガム、および 300 ppm SAG 471 よりなる培地 1.5 ℓ を入れた 5 つの 2 ℓ 発酵槽のおおのに、遠心分離により前の発酵から回収した細胞を接種した。再循環した細胞の量は 7 % から 100 % まで変えられ、そして窒素量が 0.5 % から 0 % まで、すなわち再循環した細胞の量に逆比例して変えられた。空気の流速は 0.6 ℓ / ℓ /分、羽根車の速度 680 rpm であつた。出発 pH は希塩酸で 4 に調整された。発酵培地の組成が 9 日後に分析され、そして収量が計算された。その結果は第 2 表に示すとおりである。

第 2 表

| 再循環細胞 % | エリトリトールの収量 (1) % | 全ポリオールの収量 (1) % |
|---------|------------------|-----------------|
| 7       | 35               | 43              |
| 20      | 40               | 47              |
| 40      | 38               | 55              |
| 60      | 38               | 55              |
| 100     | 50               | 70              |

(註) (1) 消費したデキストロースに基づく。“全ポリオール”はエリトリトール、グリセロール、およびリビトールを含む。